DIE BINDUNG VON CHLORPROMAZIN, DIAZEPAM, IMIPRAMIN UND PROPRANOLOL AN GEWEBE DES MENSCHEN

Rüdiger von Horstig

Disbui. München
1988

UNIV.
LIBRARY
CAL.

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Forth

DIE BINDUNG VON CHLORPROMAZIN, DIAZEPAM, IMIPRAMIN UND PROPRANOLOL AN GEWEBE DES MENSCHEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rüdiger von Horstig
aus
München

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz .....

.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth .....

.....

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: .....

.....

Dekan: Prof. Dr. W. Spann .....

.....

Tag der mündlichen Prüfung: 7. April 1988 .....

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Kurz für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit.

Frau Dr. G. Schuhmann danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau U. Schwaiger, Herrn Dr. K. Walter und Herrn Dr. med. habil. Fichtl danke ich für die technische Unterstützung und das gute Klima im Labor.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555407_0010

INHALTSVERZEICHNIS:

Seite

1.EINLEITUNG.....1

2.METHODIK.....3

2.1.Verwendete Pharmaka.....3
2.2.Definition der Pharmakonlösungen.....5
2.3.Gewebe und ihre Aufbereitung.....5
2.4.Versuchsansätze und Ultrafiltration.....6
2.5.Messung von Wassergehalt und Radioaktivität.....8
2.6.Berechnung des an die Gewebe gebundenen Anteils der Pharmaka.....10
2.7.Berechnung der Unterschiede zwischen der Bindung ohne und der Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons.....11

3.ERGEBNISSE.....12

4.DISKUSSION.....15

4.1.Kritik der Methode.....15
4.1.1.Gewebe.....15
4.1.2.Ultrafiltration.....16
4.1.3.Einfluß der Temperatur.....17
4.2.Beziehungen zwischen der Bindungsfähigkeit verschiedener Gewebshomogenate und von Plasmaproteinen.....17
4.3.Beziehungen zwischen der Bindungsfähigkeit der einzelnen Pharmaka.....20
4.4.Beziehungen zwischen Pharmakonbindungen an Gewebshomogenate innerer Organe und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Pharmaka.....21

Seite

4.5.Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen der bisherigen Korrelationsanalysen.....22
4.5.1.Bindungsfähigkeit der Gewebshomogenate.....23
4.5.2.Bindungsfähigkeit der Pharmaka.....24
4.5.3.Beziehungen der Bindung mit physikalisch-chemischen Parametern der Pharmaka.....24
4.6.Berechnung der Bindung eines Pharmakons aus den physikalisch-chemischen Parametern des Pharmakons..25
4.7.Beziehungen zwischen den Werten von a.....28
4.8.Schlußfolgerungen aus den Korrelations-analysen mit den Werten von a.....31
4.9.Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons... 32
4.10.Vergleich der Bindungsverhältnisse bei Mensch und Kaninchen.....32

5.ZUSAMMENFASSUNG.....35

6.LITERATURVERZEICHNIS.....36

7.LEBENSLAUF.....41

1. EINLEITUNG

Pharmaka können im menschlichen Körper nicht nur an die Proteine des Blutplasmas gebunden werden, sondern auch an bindungsfähige Strukturen in inneren Organen und in der Muskulatur. Rechnet man überschlägig eine Masse von 20 Kilogramm für die Gewebeproteine im Gegensatz zu 180 Gramm für die Plasmaproteine, so wird die Bedeutung der Gewebsbindung für die Relevanz pharmakokinetischer Modelle ersichtlich: Da nur der nicht gebundene Anteil eines Pharmakons frei diffundieren kann, ergibt sich durch eine mögliche hohe Bindung eines Stoffes im Gewebe ein großer Einfluß auf Verteilung und Ausscheidung, Pharmakonwirkung und Geschwindigkeit einer Metabolisierung (Habermann 1979).

Während die Bindung von Arzneistoffen an Plasmabestandteile in den letzten 20 bis 30 Jahren häufig Gegenstand von Untersuchungen war, besaß die Wissenschaft noch vor einem Jahrzehnt nur wenige oder gar keine Informationen über das Ausmaß der Bindung an andere Bestandteile des menschlichen Körpers. Bis heute haben nun viele Autoren die Pharmakonbindung an Organe von Tieren erforscht, nur wenige jedoch die an Gewebe des Menschen.

Es existieren Daten über die Bindung an Muskulatur (Fichtl 1974) und innere Organe (Fichtl 1983).

Es konnte auch gezeigt werden, daß die Daten aus Bindungsstudien in vitro gut mit den Verhältnissen in vivo übereinstimmen (Schuhmann 1985).

Man kennt die Bindung einiger Pharmaka an Plasmaproteine in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons, auch die Bindungsverhältnisse an einzelnen Rezeptoren sind erforscht; über die Situation im Gewebe in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons sind nur sehr allgemeine Angaben zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Ausmaß der Bindung einzelner Pharmaka an Gewebe innerer Organe zu bestimmen: Hirn-, Herzmuskel-, Lungen-, Leber- und Nierengewebe des Menschen werden untersucht.
Zusätzlich wird der Versuch unternommen, herauszufinden, ob diese Bindung durch die Anwesenheit eines zweiten Pharmakons beeinflusst werden kann.

Als Testsubstanzen dienen Stoffe, die beim physiologischen intrazellulären pH-Wert von 7,0 als Kationen vorliegen und unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Lipidlöslichkeit und Ionisationsgrad, aufweisen.

2. METHODIK

Die Bestimmung des freien Anteils eines Pharmakons ermöglicht die Berechnung des gebundenen Teils, wenn die gesamte Menge des eingesetzten Pharmakons bekannt ist. Meßmethode ist das Standardverfahren der Ultrafiltration von Gewebshomogenaten (Kurz et al. 1977; Kurz und Fichtl 1983) mit anschließender Bestimmung der Arzneistoffkonzentration in den Ultrafiltraten. Da radioaktive Tracer eingesetzt werden, erfolgt die Konzentrationsbestimmung durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Herzog 1983).

2.1. Verwendete Pharmaka

Die Tabellen No. 1 - 3 enthalten Angaben über die verwendeten unmarkierten und radioaktiv markierten Substanzen und ihre physikalisch - chemischen Eigenschaften. Die markierten Pharmaka wurden von der Firma Amersham geliefert. Imipramin und Propranolol waren mit ^{3}H, Diazepam und Chlorpromazin mit ^{14}C markiert.

IMIPRAMIN: Tofranil^{R}- Reinsubstanz, Ciba-Geigy
Molekulare Masse : 316,9 d (-HCl)

DIAZEPAM : Valium^{R}- Reinsubstanz, Hoffmann-LaRoche
Molekulare Masse : 284,76 d

PROPRANOLOL: Dociton^{R}- Reinsubstanz , ICI
Molekulare Masse : 295,8 d (-HCl)

CHLORPROMAZIN: Megaphen^{R}- Reinsubstanz , Bayer
Molekulare Masse : 355,3 d (-HCl)

Tabelle 1: Generic names, Handelsnamen, Hersteller und molekulare Massen der nicht radioaktiv markierten Pharmaka
(-HCl) = Molekulare Masse der als Hydrochlorid vorliegenden Substanz

UNIV. LIBRARY BRL

	Spezifische Aktivität	Radioaktive Konzentration	Radiochem. Reinheit
IMI	21Ci/mmol°	1,0mCi/ml°	98%°
DIZ	57mCi/mmol°	0,1mCi/ml°	98%°
PRO	25Ci/mmol°	1,0mCi/ml°	98%°
CPZ	108mCi/mmol°	0,1mCi/ml°	98%°

Tabelle 2: Spezifische Aktivität, radioaktive Konzentration und radiochemische Reinheit der verwendeten markierten Substanzen.
Chlorpromazin = CPZ; Diazepam = DIZ; Imipramin = IMI; Propranolol = PRO; ° = Herstellerangaben

	pK_a Wert	$VK_{O/P}$ bei pH=7	% ion. bei pH=7
IMI	9,4[c]	146[d]	99,60
DIZ	3,3[a]	720[d]	0,02
PRO	9,5[b]	5,4[d]	99,70
CPZ	9,3[a]	868[d]	99,50

Tabelle 3: Physikalisch - chemische Eigenschaften der verwendeten Pharmaka
$VK_{O/P}$ = Verteilungsquotient Oktanol / Phosphatpuffer
% ion. = Prozentualer Anteil der ionisierten Moleküle, berechnet nach folgender Formel:

$$\% \text{ ion.} = \frac{1}{1 + 10^{(7 - pK_a)}} \cdot 100 \qquad (1)$$

Literaturangaben: a = Herzfeldt (1980), b = Martindale (1977), c = Seiler (1974), d = Fichtl (1983).

2.2. Definition der Pharmakonlösungen

Von allen vier Pharmaka wurde jeweils mit den nicht markierten Reinsubstanzen und destilliertem Wasser eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l hergestellt. Die Lösung I entstand durch Verdünnen der Stammlösung auf eine Konzentration von 10^{-4} Mol/l und Zugabe radioaktiver Tracerlösung im Verhältnis 1 zu 100. Durch Verdünnung der Lösung I auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ Mol/l wurde die radioaktive Lösung II hergestellt, deren Konzentration ungefähr im Bereich der erwarteten Pharmakonkonzentration im Ultrafiltrat lag. Die Verdünnungsschritte wurden mit Phosphatpuffer nach Rauen (isoton; Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4; pH = 7,0; 0,125 Mol/l) durchgeführt.

2.3. Gewebe und ihre Aufbereitung

Sämtliche Gewebeproben stammten von Unfalltoten, deren Leichen bis zur Sektion gekühlt aufbewahrt worden waren. Die Organe wurden während der Sektion präpariert und sofort tiefgefroren. Die größte Zeitspanne zwischen Tod und Präparation war auf 36 Stunden festgelegt. Es wurde darauf geachtet, daß die Präparate möglichst von jungen, gesunden Erwachsenen stammten und daß kurz vor dem Tod keine Arzneimittel eingenommen worden waren.
Zum Versuch erfolgte, nach Freipräparation der Gewebsportionen von Bindegeweben und Gefäßanteilen im halbgefrorenen Zustand, eine Prüfung auf Zeichen des Zerfalles. Nur wenn makroskopisch und olfaktorisch keine Anzeichen der Lyse zu erkennen waren, wurden die Gewebeproben verwendet.

Die Gewebe wurden mit Schere und Skalpell fein zerkleinert und unter Zugabe von Phosphatpufferlösung (pH = 7,0; 0,125 Mol/l; s.o.) im Verhältnis von 10 Gewichtsanteilen Gewebe zu 6 Gewichtsanteilen Puffer mit einem Gerät der Firma Emmendinger Maschinenbau, Emmendingen, bei möglichst niedrigen Temperaturen homogenisiert. Die Verdünnung mit Puffer erleichterte die Verarbeitung (Kurz und Fichtl 1983). Der pH-Wert des resultierenden Homogenates wurde kontrolliert durch Zugabe einer 20%igen Na_2CO_3 - Lösung auf 7,0 eingestellt (pH-Meter Typ 646, Fa.Knick, Berlin).
Die Homogenate wurden nicht gepoolt. Pro Versuch wurde jeweils nur Gewebe einer einzelnen Person verwendet.
Pro Organ, das untersucht wurde, kamen Gewebe von jeweils 3 verschiedenen Personen zum Einsatz.

2.4. Versuchsansätze und Ultrafiltration

Sollte nur ein Pharmakon gebunden werden, so wurden 16 Gramm Homogenat mit 2 Gramm der Lösung I und 2 Gramm Pufferlösung vermischt. Sollten zwei Pharmaka gebunden werden, so wurden zu 16 Gramm Homogenat je 2 Gramm der Lösung I des jeweiligen Arzneistoffes gegeben.
Weitere 16 Gramm Homogenat bildeten mit vier Gramm Pufferlösung den Leerwertansatz. Jeder Ansatz enthielt so einen Gewebeanteil von 50 %. Die Arzneistoffkonzentration im fertigen Ansatz betrug 10^{-5} Mol/l je Pharmakon. Die Ansätze wurden nun für 2 bis 4 Stunden bei + 4 bis + 8°C gelagert; jede halbe Stunde fand eine gründliche Durchmischung statt.

Die Ultrafiltration wurde auf folgende Art und Weise durchgeführt:
Als Membranen dienten Visking^R- Dialyseschläuche des Typs 20/32 der Firma Serva, Heidelberg.

Drei dieser Schläuche erhielten eine Füllung wie unter 1. beschrieben, die nächsten drei wie unter 2., und so weiter bis schließlich 48 gefüllte Dialyseschläuche bereitstanden.

1. 6 ml Puffer als **Leerwert (^{3}H)**
2. 6 ml Lösung II von **Imipramin**
3. 6 ml Lösung II von **Diazepam**
4. 6 ml Lösung II von **Propranolol**
5. 6 ml Lösung II von **Chlorpromazin**
6. 6 ml Puffer als **Leerwert (^{14}C)**

Die folgenden Ansätze enthielten, wie oben beschrieben, die Lösungen I der jeweiligen Pharmaka oder Puffer:

7. 6 Gramm Homogenat mit **Puffer (Leerwert ^{3}H)**
8. 6 Gramm Homogenat mit **Imipramin**
9. 6 Gramm Homogenat mit **Diazepam**
10. 6 Gramm Homogenat mit **Propranolol**
11. 6 Gramm Homogenat mit **Chlorpromazin**
12. 6 Gramm Homogenat mit **Imipramin+Diazepam**
13. 6 Gramm Homogenat mit **Imipramin+Chlorpromazin**
14. 6 Gramm Homogenat mit **Propranolol+Diazepam**
15. 6 Gramm Homogenat mit **Propranolol+Chlorpromazin**
16. 6 Gramm Homogenat mit **Puffer (Leerwert ^{14}C)**

Die Schläuche wurden an beiden Enden verknotet, in Siebeinsätze gelegt und diese in passende Zentrifugengläser gestellt. Die Gläser wurden mit Parafilm dicht verschlossen. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 200 - bis 250 - facher Erdbeschleunigung in einer gekühlten Zentrifuge der Firma Stock, Marburg, bis circa 0,5 ml Ultrafiltrat abgepresst waren.

2.5. Messung von Wassergehalt und Radioaktivität

Der Wassergehalt der Homogenate wurde durch Trocknung kleiner Proben aus den Leerwertansätzen bestimmt. Die Proben verblieben bis zum Erreichen eines konstanten Gewichts bei 110°C im Wärmeschrank.
Der prozentuale Wasseranteil im Homogenatansatz wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\%WG = 100 \cdot \left(1 - \frac{TG}{FG} \right) \qquad (2)$$

(%WG = Wassergehalt; TG = Homogenatgewicht nach Trocknung; FG = Homogenatgewicht vor Trocknung)

Die Radioaktivität der Ultrafiltrate als Maß für den nicht an die Gewebshomogenate gebundenen Anteil der eingesetzten Pharmaka wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung mit Bray ' scher Lösung als Medium ermittelt (Herzog 1983).
Je 0,2 ml Ultrafiltrat wurden in Nylongefäßen mit 15,0 ml Bray ' scher Lösung vermischt.
Die Messung der Radioaktivität erfolgte in der Hälfte der Versuche mit einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 3385. Die andere Hälfte der Messungen wurde auf einem LKB Wallac Liquid Scintillation Counter, Typ 1217 Rackbeta mit DPM-Einheit durchgeführt.
Die Radioaktivität der Proben wurde aus den im Zähler gewonnenen Daten nach untenstehenden Formeln berechnet:

$$Eff = A(0) + A(1) \cdot QF + A(2) \cdot QF^2 + A(3) \cdot QF^3 \qquad (3)$$

(Eff = Efficiency; A(0) bis A(3) = Eichkonstanten des Zählers; QF = Quenchfaktor)

Nur <u>ein</u> Pharmakon im Ansatz:

$$DPM = \frac{(CPM - BW)}{Eff} \qquad (4)$$

(DPM = Decompositions per minute; CPM = Counts per minute; BW = Blindwert einer Probe ohne Radioaktivität; Eff = Efficiency)

<u>Zwei</u> Pharmaka, ^{3}H und ^{14}C markiert, im Ansatz:

Es gelten die Definitionen der Variablen wie oben und zusätzlich:

H = Höherenergetisches Isotop (^{14}C);

N = Niederenergetisches Isotop (^{3}H);

HN = H im niederenergetischen Kanal gemessen.

Mit folgenden Formeln ergeben sich:

$$DPM(H) = \frac{(CPM(H) - BW)}{Eff(H)} \qquad (5)$$

(Eff(H) mit A(0) bis A(3) für H)

$$DPM(N) = \frac{CPM(N)-BW(N)-((CPM(H)-BW(H)) \cdot Eff(HN))}{Eff(N)} \qquad (6)$$

(Eff(N) mit A(0) bis A(3) für N;
Eff(HN) mit A(0) bis A(3) für HN)

2.6. Berechnung des an die Gewebe gebundenen Anteils der Pharmaka

Die Berechnung der Bindung eines Pharmakons an ein Gewebshomogenat erfolgte über die Messung der Aktivität des nichtgebundenen, also frei durch die Filtermembran beweglichen, Anteils des Pharmakons bei bekannter Gesamtkonzentration des Pharmakons im Homogenatansatz.

In die Berechnung gingen die Aktivitäten folgender Ultrafiltrate ein:

HP = Homogenatansatz mit Lösung I
H0 = Homogenatleerwert
RL = Lösung II
P0 = Phosphatpuffer

Ferner: %WG = Wassergehalt der Homogenatansätze

Zusätzlich der wie folgt definierte Verdünnungsfaktor V:
V sei das Verhältnis der Gesamtkonzentration eines Pharmakons im Homogenatansatz zur Konzentration dieses Pharmakons in der Lösung II.

Mit den unten definierten Variablen AF und AG wurde der gebundene Anteil des Pharmakons errechnet:

$$AF = HP - H0 \qquad (7)$$

$$AG = RL - P0 \qquad (8)$$

%B = Gebundener Anteil des Pharmakons

$$\%B = 100 \cdot \left(1 - \frac{AF \cdot \left(\frac{\%WG}{100} \right)}{AG \cdot V} \right) \qquad (9)$$

Diese Berechnung erfolgte bei Bindung einzelner Substanzen und bei Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons.

2.7. Berechnung der Unterschiede zwischen der Bindung ohne und der Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons

Folgende Kombinationen der Bindungen wurden mit der Bindung der einzelnen Pharmaka an die jeweiligen Gewebe verglichen:

Bindung von	verglichen mit	Bindung von	in Anwesenheit von
IMI		IMI	DIZ
IMI		IMI	CPZ
DIZ		DIZ	IMI
DIZ		DIZ	PRO
PRO		PRO	DIZ
PRO		PRO	CPZ
CPZ		CPZ	IMI
CPZ		CPZ	PRO

Tabelle 4: Darstellung des Vergleichsschemas zwischen Bindungen ohne und Bindungen mit Anwesenheit eines zweiten Pharmakons.
Chlorpromazin = CPZ; Diazepam = DIZ; Imipramin = IMI; Propranolol = PRO.

Die acht Wertepaare wurden nun nach David, Pearson und Stephens auf Normalverteilung und mit dem F-Test auf gleiche Varianz geprüft. Waren in diesen Vortests die Kriterien erfüllt, wurden mit dem t-Test signifikante Unterschiede ermittelt (Ramm und Hofmann 1982).

3. ERGEBNISSE

In Tabelle 5 und 6 sind die Werte zusammengefasst, die für die Bindungen der untersuchten Pharmaka ohne und in Gegenwart eines zweiten Pharmakons gefunden wurden.

	HIRN	HERZ	NIERE	LEBER	LUNGE
CPZ	95,2±1,13	96,0±0,22	97,1±0,29	97,9±0,42	95,1±1,19
DIZ	88,9±2,80	90,0±0,62	88,3±3,21	92,5±0,89	76,2±8,38
IMI	89,0±1,91	93,4±1,45	90,3±1,51	94,0±0,58	73,1±8,05
PRO	90,7±0,62	93,4±1,00	90,8±0,57	94,8±0,53	78,3±3,87

Tabelle 5: Bindung von Chlorpromazin (CPZ), Diazepam (DIZ), Imipramin (IMI) und Propranolol (PRO) an verschiedene Gewebe. Die Bindung ist in % mit Standardabweichung angegeben. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen an Geweben von jeweils 3 Personen.

	HIRN	HERZ	NIERE	LEBER	LUNGE
IMI *	85,9±3,69	90,1±1,87	89,6±0,91	92,3±1,74	72,4±3,16
DIZ	85,8±2,95	86,6±0,98	87,6±2,70	90,1±0,78	78,2±2,76
IMI *	86,6±3,61	91,1±1,89	90,7±1,21	92,2±1,97	71,7±6,30
CPZ	92,2±1,34	93,6±0,28	96,1±0,71	96,3±0,63	92,6±1,19
PRO *	88,1±0,78	90,9±1,11	91,7±0,81	92,9±2,56	79,6±3,43
DIZ	84,7±2,51	86,1±0,92	88,1±3,09	89,4±0,93	76,9±1,93
PRO *	88,1±0,89	92,1±0,78	91,7±0,69	93,2±2,55	82,0±3,37
CPZ	91,2±1,19	93,2±0,39	95,7±0,77	96,0±1,24	92,0±1,05

Tabelle 6: Bindung von Chlorpromazin (CPZ), Diazepam (DIZ), Imipramin (IMI) und Propranolol (PRO) an verschiedene Gewebe in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons. * = in Anwesenheit von .... Weiteres siehe Legende zu Tab. 5.

In den Tabellen No. 7 bis 10 werden die unterschiedlichen Bindungen in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons dargestellt und zwar für jedes untersuchte Gewebe die jeweilige Einfachbindung eines Pharmakons und die Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons zusammen mit der Irrtumswahrscheinlichkeit für jeden Vergleich. Hier werden nur Bindungen der Pharmaka berücksichtigt, deren Einfachbindung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 0,05 signifikant von der Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons unterschieden werden kann. Es zeigt sich , daß in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons die Bindungen nicht nur vermindert sind, sondern daß auch gleichbleibende oder erhöhte Bindungsraten auftreten.

	HIRN	HERZ	NIERE	LEBER	LUNGE
1. CPZ alleine gebunden:					
CPZ	20,90±5,98	24,07±1,42	34,23±3,69	49,73±11,96	20,43±5,59
2. CPZ in Anwesenheit von IMI gebunden:					
CPZ	12,00±2,13	14,53±0,71	24,90±5,37	26,80±4,75	12,77±2,08
	p<0,05	p<0,001	n.s.	p<0,05	n.s.
3. CPZ in Anwesenheit von PRO gebunden:					
CPZ	10,57±1,68	13,83±0,85	22,80±4,68	26,43±10,45	11,57±1,54
	p<0,05	p<0,001	p<0,05	n.s.	p<0,05

Tab. 7: Darstellung der Bindungen von Chlorpromazin (CPZ) als alleine gebundenes Pharmakon und in Anwesenheit von Imipramin (IMI) und Propranolol (PRO). Angabe der Bindungen und der Standardabweichungen als Quotient des gebundenen zum freien Anteil (B/F). n.s. = kein signifikanter Unterschied, p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den jeweiligen Vergleich zwischen Einfachbindung und Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons.

	HIRN	HERZ	NIERE	LEBER	LUNGE
1. DIZ alleine gebunden:					
DIZ	8,47±2,67	9,00±0,63	8,00±2,62	12,50±1,51	3,53±1,39
2. DIZ in Anwesenheit von IMI gebunden:					
DIZ	6,23±1,46	6,50±0,53	7,37±2,11	9,17±0,81	3,60±0,60
	n.s.	p<0,01	n.s.	p<0,05	n.s.
3. DIZ in Anwesenheit von PRO gebunden:					
DIZ	5,63±1,14	6,20±0,46	7,87±2,59	8,47±0,81	3,37±0,32
	n.s.	p<0,01	n.s.	p<0,05	n.s.

Tab. 8: Darstellung der Bindungen von Diazepam (DIZ) als alleine gebundenes Pharmakon und in Anwesenheit von Imipramin (IMI) und Propranolol (PRO). Weiteres siehe Legende zu Tab. 7 (S. 13).

	HIRN	HERZ	NIERE	LEBER	LUNGE
1. PRO alleine gebunden:					
PRO	9,77±0,74	14,37±2,30	9,87±0,67	18,37±2,07	3,70±0,78
2. PRO in Anwesenheit von DIZ gebunden:					
PRO	7,40±0,56	10,13±1,46	11,10±1,20	14,50±6,52	3,97±0,81
	p<0,02	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.
3. PRO in Anwesenheit von CPZ gebunden:					
PRO	7,47±0,67	11,73±1,33	11,17±1,00	15,50±7,74	4,73±1,19
	p<0,02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 9: Darstellung der Bindungen von Propranolol (PRO) als alleine gebundenes Pharmakon und in Anwesenheit von Chlorpromazin (CPZ) und Diazepam (DIZ). Weiteres siehe Legende zu Tab. 7 (S. 13).

	HIRN	HERZ	NIERE	LEBER	LUNGE
1. IMI alleine gebunden:					
IMI	8,37±1,78	14,67±3,76	9,47±1,47	15,73±1,55	3,00±1,35
2. IMI in Anwesenheit von DIZ gebunden:					
IMI	6,43±2,25	9,33±2,15	8,70±0,79	12,47±3,43	2,67±0,40
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
3. IMI in Anwesenheit von CPZ gebunden:					
IMI	6,93±2,42	10,63±2,78	9,87±1,53	12,43±3,48	2,63±0,74
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 10: Darstellung der Bindungen von Imipramin (IMI) als alleine gebundenes Pharmakon und in Anwesenheit von Diazepam (DIZ) und Chlorpromazin (CPZ). Weiteres siehe Legende zu Tab. 7 (S. 13).

4. DISKUSSION

4.1. Kritik der Methode

4.1.1. Gewebe

Menschliche Organe verlieren mit dem Tod des Individuums nicht schlagartig ihre Struktur oder Zusammensetzung. Die postmortalen Veränderungen ziehen sich in der Regel über längere Zeit hin. Zellen einzelner Organe können den Tod des Individuums um Stunden bis Tage, ja sogar Wochen überleben (Gedigk und Totovic 1977).
Äußere Zeichen des Gewebstodes sind meist Zeichen der Lyse, die in einer Veränderung von Farbe, Geruch oder Konsistenz ihren Ausdruck finden.
Deßhalb wurden nur solche Gewebsproben verwendet, die makroskopisch keine Zeichen der Lyse aufwiesen.
Die postmortal auftretende Azidose der Gewebe ist zum einen vom Ausmaß der ablaufenden anaeroben Glykolyse, zum anderen auch von der Enzymausstattung der Zellen abhängig. Auf Grund

dieser Umstände mußten zu den Gewebshomogenaten, wie in Tab. 11 gezeigt, bis zum Erreichen eines pH - Wertes von 7,0 unterschiedliche Mengen an 20%iger Na-Carbonat - Lösung zugegeben werden. Nach Fichtl (1983) verändert der Blut- oder Hämoglobingehalt der Organe das Ausmaß der Bindungen nicht wesentlich.

	pH-Wert	Na-Carbonat (ml)
Hirn	6,77 ± 0,025	1,00 ± 0,20
Herz	6,64 ± 0,061	1,33 ± 0,31
Lunge	6,81 ± 0,172	0,50 ± 0,50
Leber	6,48 ± 0,080	1,47 ± 0,46
Niere	6,62 ± 0,102	1,83 ± 0,90

Tabelle 11: pH - Werte der Homogenate (zu diesem Zeitpunkt 62,5 % Gewebeanteil, s. S. 6 oben) und Menge an 20%iger Na_2CO_3 - Lsg., die bis zum Erreichen eines pH - Wertes von 7,0 zugegeben wurde. Angaben bezogen auf 180 g Homogenat, mit Standardabweichung, n = 3.

4.1.2. Ultrafiltration

Um den nichtgebundenen Anteil der Pharmaka zu isolieren, wurde das Verfahren der Ultrafiltration angewendet. Diese Methode erbringt gute Ergebnisse, wenn die spezifischen Fehlermöglichkeiten berücksichtigt werden (Kurz et al. 1977).
Die Adsorption von Pharmakonmolekülen an die Membranen und deren mögliche Ladung wurden durch die parallele Ultrafiltration von Lösung II und Puffer weitgehend als Fehlerquellen ausgeschlossen. Der Siebeffekt kam durch die niedrigen molekularen Massen der verwendeten Substanzen bei einer oberen Filtergrenze von 8000 bis 15000 Dalton nur schwach zum Tragen. Die Auswirkungen der während der Ultrafiltration ansteigenden Proteinkonzentration im Homogenatansatz und des Donnan - Effektes konnten durch die Begrenzung der Ultrafiltratmenge auf 10% der Homogenatmenge klein gehalten werden. Auf 50% Gewebeanteil verdünnte Homogenate wurden verwendet, da unverdünnte Homogenate auf Grund ihrer pastenartigen Konsistenz schwierig zu verarbeiten sind und zusätzliche Fehlerquellen in sich bergen (Kurz und Fichtl 1983).

4.1.3. Einfluß der Temperatur

Um eine wärmebedingte Lyse zu verhindern, erfolgten Lagerung und Verarbeitung bei niedrigen Temperaturen. Die Gewebe wurden bei -20°C aufbewahrt. Die vorbereitende Präparation der Gewebe wurde im halbgefrorenen Zustand ausgeführt.
Die Homogenisierung erfolgte unmittelbar darauf unter Zugabe des gekühlten Phosphatpuffers, um einer Alteration der Gewebe durch die während des Homogenisierens entstehende Wärme vorzubeugen. Nur zur endgültigen pH - Einstellung wurde eine kurzfristige Erwärmung auf +20°C zugelassen. Die Homogenate wurden dann wieder abgekühlt und mit den Pharmakonlösungen versetzt. Die Temperatur während des Zentrifugierens betrug circa +1°C.

4.2. Beziehungen zwischen der Bindungsfähigkeit verschiedener Gewebshomogenate und von Plasmaproteinen

Die Bindungsdaten der vier Pharmaka Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin und Propranolol an Homogenate menschlicher Gewebe innerer Organe wurden, nach Geweben geordnet, untereinander und mit Daten der Bindung an Plasmaproteine und an Homogenate von Skelettmuskelgewebe verglichen (Tabelle 12). Um die Korrelationskoeffizienten berechnen zu können (Sachs 1982) und um eine größere Spannweite unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften der Pharmaka zu erfassen, wurden Bindungsdaten der vier, bei pH = 7,0 als Anionen vorliegenden Pharmaka Phenytoin, Salizylsäure, Thiopental und Warfarin (Touroutoglou 1987) in die Berechnung mit einbezogen. Die Daten für die Bindung an Homogenate von menschlichem Skelettmuskelgewebe, sowohl der als Kationen als auch der als Anionen vorliegenden Pharmaka entstammen der Arbeit von Fichtl (1983). Zusätzlich wurden Bindungsreihen ohne die meist am höchsten (Chlorpromazin) und am niedrigsten (Salizylsäure) gebundenen Stoffe verglichen (Tab. 13), weiterhin Reihen ohne die meist mittelstark gebundenen Substanzen Propranolol und Thiopental (Tab. 14). Die Ergebnisse dieser Analysen werden unter 4.5.1. besprochen.

	Plasma	Lunge	Muskel	Leber	Herz	Hirn
Niere	n.s.	n.s.	0,881*	1,000*	0,952*	0,976*
Hirn	n.s.	n.s.	0,905*	0,976*	0,881*	
Herz	n.s.	n.s.	0,833*	0,886*		
Leber	n.s.	n.s.	0,881*			
Muskel	n.s.	n.s.				
Lunge	n.s.					

Tabelle 12: Korrelation von Reihen aus den Bindungen von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Propranolol, Diphenylhydantoin, Thiopental, Warfarin und Salizylsäure an Plasmaproteine und Gewebshomogenate. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(8)}$ des einseitigen Tests berechnet. Die Daten für die Plasmabindung entstammen folgenden Literaturstellen: Chlorpromazin (Curry 1972), Diazepam (Allen und Greenblatt 1981), Imipramin (Kristensen und Gram 1982), Propranolol (Evans et al. 1973), Diphenylhydantoin (Odar-Cederlüf und Borga 1974), Thiopental (Dayton et al. 1967), Warfarin (Shepard et al. 1977) und Salizylsäure (Ganshorn 1975). Muskel = Skelettmuskelgewebe; n.s. = nicht signifikant; * = signifikant für $p < 0,01$.

	Hirn	Herz	Leber	Lunge	Muskel
Niere	0,943*	0,886°	1,000*	n.s.	n.s.
Muskel	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Lunge	n.s.	n.s.	n.s.		
Leber	0,943*	0,886°			
Herz	n.s.				

Tabelle 13: Korrelation von Reihen aus den Bindungen von Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental und Warfarin an Gewebshomogenate. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(6)}$ des einseitigen Tests berechnet. Muskel = Skelettmuskelgewebe; n.s. = nicht signifikant; * = signifikant für $p < 0,01$; ° = signifikant für $p < 0,05$

	Hirn	Herz	Leber	Lunge	Muskel
Niere	0,943*	0,943*	1,000*	n.s.	0,943*
Muskel	1,000*	0,829°	0,943*	n.s.	
Lunge	n.s.	n.s.	n.s.		
Leber	0,943*	0,943*			
Herz	0,829°				

Tabelle 14: Korrelation von Reihen aus den Bindungen von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Phenytoin, Warfarin und Salizylsäure an Gewebshomogenate. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(6)}$ des einseitigen Tests berechnet. Muskel = Skelettmuskelgewebe; n.s. = nicht signifikant; * = signifikant für $p < 0,01$; ° = signifikant für $p < 0,05$

4.3. Beziehungen zwischen der Bindungsfähigkeit der einzelnen Pharmaka

Die Daten der Bindung von acht, wie oben beschrieben ausgewählten, Pharmaka an Homogenate menschlicher Gewebe innerer Organe und Skelettmuskulatur wurden, hier jedoch nach Arzneistoffen geordnet, miteinander verglichen (Tabelle 15). Daten von Fichtl (1983) und Touroutoglou (1987) wurden hinzugezogen. Die Ergebnisse dieser Analyse werden unter 4.5.2. besprochen.

	CPZ	DIZ	IMI	PRO	PHT	TPL	WAR
SAL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,886°
WAR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TPL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
PHT	n.s.	n.s.	1,000*	1,000*			
PRO	n.s.	n.s.	1,000*				
IMI	n.s.	n.s.					
DIZ	0,829°						

Tabelle 15: Korrelation von Reihen aus den Bindungen von Chlorpromazin (CPZ), Diazepam (DIZ), Imipramin (IMI), Propranolol (PRO), Phenytoin (PHT), Warfarin (WAR), Thiopental (TPL) und Salizylsäure (SAL) an Gewebshomogenate von Hirn, Herzmuskel, Lunge, Leber, Niere und Skelettmuskel. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(6)}$ des einseitigen Tests berechnet. n.s. = nicht signifikant; * = signifikant für $p < 0{,}01$; ° = signifikant für $p < 0{,}05$

4.4. Beziehungen zwischen Pharmakonbindungen an Gewebshomogenate innerer Organe und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Pharmaka

Mit den Bindungsdaten der Pharmaka Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental, Warfarin und Salizylsäure an Homogenate menschlicher Gewebe innerer Organe wurden, nach Geweben geordnet, Reihen gebildet und diese mit Reihen aus physikalisch-chemischen Parametern der Pharmaka korreliert. Zur Berechnung wurden Daten von Touroutoglou (1987) hinzugezogen. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse für Reihen mit allen Pharmaka. Hier ergaben sich mit dem pK_a-Wert einige signifikante Korrelationen. Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse für Reihen ohne die Pharmaka Propranolol und Thiopental. Hier ergaben sich vor allem mit dem Verteilungskoeffizienten Oktanol / Phosphatpuffer signifikante Korrelationen. Als der Test mit Reihen ohne die Werte von Chlorpromazin und Salizylsäure ausgeführt wurde, ergaben sich weder bei Korrelationen der Bindung mit dem Ionisationsgrad, noch mit dem Verteilungskoeffizienten, noch mit dem pK_a- Wert signifikante Ergebnisse.

B/F korreliert	Hirn	Herz	Leber	Lunge	Niere
1. mit %ion.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2. mit VK_{OP}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
3. mit pK_a	0,643°	0,810°	0,762°	n.s.	0,762°

Tabelle 16: Korrelationen von Reihen aus den Bindungen von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental, Warfarin und Salizylsäure an Gewebshomogenate mit Reihen aus den physikalisch-chemischen Parametern der Pharmaka. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(8)}$ des einseitigen Tests berechnet. B/F = Bindung als Verhältnis des gebundenen zum freien Teil. %ion. = Anteil der ionisierten Moleküle bei pH = 7,0; Berechnung s. Formel (1), S. 4. Für anion. Stoffe Daten von Touroutoglou (1987). VK_{OP} = Verteilungskoeffizient Oktanol / Phosphatpuffer. pK_a = pK_a- Wert. n.s. = nicht signifikant. ° = signifikant für $p < 0,05$.

B/F korreliert

	Hirn	Herz	Leber	Lunge	Niere
1. mit %ion.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2. mit VK_{OP}	0,943*	n.s.	0,829°	n.s.	0,829°
3. mit pK_a	n.s.	0,886°	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 17: Korrelationen von Reihen aus den Bindungen von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Phenytoin, Warfarin und Salizylsäure an Gewebshomogenate mit Reihen aus den physikalisch-chemischen Parametern der Pharmaka. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(6)}$ des einseitigen Tests berechnet. B/F = Bindung als Verhältnis des gebundenen zum freien Teil. %ion. = Anteil der ionisierten Moleküle bei pH = 7,0; Berechnung s. Formel (1), S. 4. Für anion. Stoffe Daten von Touroutoglou (1987). VK_{OP} = Verteilungskoeffizient Oktanol / Phosphatpuffer. pK_a = pK_a- Wert. n.s. = nicht signifikant. ° = signifikant für $p < 0,05$. * = signifikant für $p < 0,01$.

4.5. Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen der bisherigen Korrelationsanalysen

Um allgemeine Gesetzmäßigkeiten erkennen zu können und um ein breiteres Spektrum unterschiedlicher physikalisch-chemischer Parameter der Pharmaka zu erfassen, wurden zu den eigenen Ergebnissen Daten von Touroutoglou und Fichtl und Daten der Plasmabindung hinzugefügt. Dies geschah auch deswegen, um vielleicht eine Erklärung für die unterschiedlichen Ausmaße der Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons finden zu können. Die sich in den durchgeführten Korrelationsanalysen ergebenden Sachverhalte führen zu den nachstehenden Schlußfolgerungen.

4.5.1. Bindungsfähigkeit der Gewebshomogenate

Während zwischen der Bindungsfähigkeit der Gewebshomogenate von Hirn, Herz, Leber, Niere und Skelettmuskulatur enge, statistisch signifikante, Beziehungen bestehen, konnten bei der Bindungsfähigkeit von Plasmaproteinen und Homogenaten von Lungengewebe untereinander und zu den übrigen untersuchten Geweben nur statistisch nicht signifikante Korrelationen gefunden werden. Dies erlaubt den Schluß, daß Plasmaproteine und Homogenate von Lungengewebe Pharmaka auf andere Weise binden als die restlichen untersuchten Gewebe, die wiederum sehr ähnliche Bindungsmechanismen aufzuweisen scheinen.

Um herauszufinden, ob pharmakonspezifische Unterschiede der Bindungsfähigkeit bestehen, wurden zum einen Bindungsdaten von Pharmakonreihen ohne die Pharmaka Chlorpromazin und Salizylsäure miteinander korreliert. Es stellte sich heraus, daß die Bindungsfähigkeiten der Homogenate innerer Organe weiterhin, jedoch nicht so eng, miteinander korrelierten. Die Korrelationen zwischen Homogenaten von Hirngewebe und Herzmuskulatur waren jedoch nicht mehr signifikant. Ferner konnten nun auch zwischen den Homogenaten von Skelettmuskulatur und den Homogenaten der übrigen Gewebe keine signifikanten Parallelitäten im Bindungsverhalten gesehen werden. Zwischen den Homogenaten von Lungengewebe und allen anderen Gewebshomogenaten konnten auch hier keine signifikanten Zusammenhänge erkannt werden.
Zum anderen wurden Bindungsreihen ohne die Pharmaka Propranolol und Thiopental korreliert. Hier ergaben sich enge Korrelationen zwischen allen Gewebshomogenaten einschließlich Skelettmuskulatur. Zwischen Homogenaten von Lungengewebe und allen anderen Homogenaten konnte auch jetzt keine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden.
Dies alles läßt folgende Schlüsse zu:

Die Bindungsreihen ohne die Pharmaka Chlorpromazin und Salizylsäure könnten Indikatoren für einen bestimmten Bindungsmechanismus sein, der zwar in verschiedenen parenchymatösen Organen zu finden ist, jedoch nicht in Organen, die hauptsächlich aus Muskelzellen bestehen.
Die Bindungsreihen ohne die Pharmaka Propranolol und Thiopental dagegen scheinen einen Bindungsmechanismus aufzuzeigen, der möglicherweise allen Organen des Menschen außer der Lunge gemeinsam ist.
Lungengewebe scheint generell eine Sonderstellung in seinem Bindungsverhalten innezuhaben.

4.5.2. Bindungsfähigkeit der Pharmaka

Die sehr engen Korrelationen, die zwischen der Bindungsfähigkeit der Pharmaka Imipramin, Propranolol und Phenytoin bestehen, lassen den Schluß zu, daß diese über den gleichen Mechanismus, möglicherweise den oben angesprochenen der parenchymatösen Organe, an die Gewebshomogenate gebunden werden.
Die Korrelationen zwischen Diazepam und Chlorpromazin einerseits, Salizylsäure und Warfarin andererseits lassen in dieser Form keine weitergehenden Schlüsse zu.

4.5.3. Beziehungen der Bindung mit physikalisch-chemischen Parametern der Pharmaka

Eine statistisch signifikante Korrelation der Bindung in Reihen mit allen acht Pharmaka an Homogenate von Hirn-, Herz-, Leber- und Nierengewebe wurde allein mit dem pK_a- Wert der Pharmaka beobachtet. Auch hier wurden zwei weitere Pharmakonreihen gebildet:
Zum einen ohne die Pharmaka Chlorpromazin und Salizylsäure: Hier wurden keinerlei statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Pharmakonbindung und physikalisch-chemischen Parametern beobachtet.

Zum anderen ohne die Pharmaka Propranolol und Thiopental: Jetzt wurden sowohl statistisch signifikante Beziehungen zwischen Bindung und Verteilungskoeffizient Oktanol/Phosphatpuffer, als auch zwischen Bindung und pK_a- Wert gesehen.
Bei der Korrelation der Pharmakonbindung an Lungengewebshomogenate mit den physikalisch-chemischen Parametern wurde in keinem Fall ein signifikanter Zusammenhang gesehen.
Dies führt zu folgenden Schlüssen:
Wiederum wurden Hinweise auf mehrere verschiedene Bindungsmechanismen gefunden:
Ein Mechanismus, der durch die Korrelationen der Bindungsreihen ohne Propranolol und Thiopental deutlich wird, scheint durch eine starke Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Parametern der Pharmaka charakterisierbar zu sein.
Ein anderer Mechanismus, wie die Korrelationen der Reihen ohne Chlorpromazin und Salizylsäure verdeutlichen, könnte von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Pharmaka unabhängig sein.
Möglicherweise könnte ein dritter Mechanismus bei der Pharmakonbindung an Lungengewebshomogenate in Betracht zu ziehen sein.

4.6. Berechnung der Bindung eines Pharmakons aus den physikalisch-chemischen Parametern des Pharmakons

Aus den oben genannten Daten und auf der Basis der daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen kann nun folgender Zusammenhang zwischen Bindung und physikalisch-chemischen Parametern abgeleitet werden:

$$\log B/F = pK_a \cdot \log VK_{OP} \qquad (10)$$

Die Überprüfung dieser Formel mit Hilfe der Rangordnungskorrelation nach Spearman erbrachte nachstehende Ergebnisse:

Wurden Bindungsreihen mit den Pharmaka Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental, Warfarin und Salizylsäure betrachtet, so ergaben sich bei keinem der Gewebshomogenate von Hirn, Herz, Leber, Lunge und Niere signifikante Korrelationen zwischen log B/F und dem Produkt aus pK_a- Wert und log des Verteilungskoeffizienten Oktanol / Phosphatpuffer (bei pH = 7,0).
Wurden Reihen ohne die Pharmaka Chlorpromazin und Salizylsäure betrachtet, so waren die gefundenen Korrelationen zwar enger, jedoch statistisch ebenfalls nicht signifikant.
Wurden Reihen ohne die Pharmaka Propranolol und Thiopental betrachtet, so ergaben sich die in Tabelle 18 gezeigten Korrelationen.

log B/F korreliert mit	Hirn	Herz	Leber	Lunge	Niere
$pK_a \cdot \log VK_{OP}$	n.s.	0,943*	0,829°	n.s.	0,829°

Tabelle 18: Korrelationen von Reihen aus den Bindungen von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Phenytoin, Warfarin und Salizylsäure an Gewebshomogenate mit Reihen aus Produkten aus pK_a- Wert und log des Verteilungskoeffizienten Oktanol / Phosphatpuffer der Pharmaka. Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(6)}$ des einseitigen Tests nach Spearman.
B/F = Bindung als Verhältnis des gebundenen zum freien Teil.
VK_{OP} = Verteilungskoeffizient Oktanol / Phosphatpuffer
pK_a = pK_a- Wert. n.s. = nicht signifikant. * = signifikant für $p < 0,01$. ° = signifikant für $p < 0,05$

In den weiteren Berechnungen wurde anstatt des pK_a- Wertes der log der Säurekonstanten K_a eingesetzt.
Zwar konnten, wie aus Tabelle 18 ersichtlich ist, gewisse Beziehungen zwischen log B/F und dem Produkt aus pK_a- Wert, bzw. log K_a, und log VK_{OP} festgestellt werden, bei der Überprüfung ergaben sich jedoch sehr große Unterschiede zwischen den berechneten Werten und den Ergebnissen der Versuche. Deßhalb wurde Gleichung (10) wie folgt umgeformt und erweitert:
Zum Ausgleich der oben angesprochenen Differenzen wurde der Faktor a eingeführt und folgendermaßen definiert:

$$\log a = \frac{\log B/F}{\log K_a \cdot \log VK_{OP}} \qquad (11)$$

Nach Umformung ergab sich die neue Form von Gleichung (10):

$$\log B/F = \log K_a \cdot \log VK_{OP} \cdot \log a \qquad (12)$$

Tabelle 19 zeigt die Werte des Faktors a:

a = 0,....

	CPZ	DIZ	IMI	PRO	PHT	TPL	WAR	SAL
Hirn	,8747	,7928	,9008	,7207	,9196	,9772	,9010	,8435
Herz	,8901	,7921	,8763	,6818	,8959	,9310	,7909	,8609
Leber	,8668	,7650	,8733	,6581	,8865	,9434	,7659	,9795
Lunge	,8955	,8748	,9474	,8286	,9344	,9767	,7716	,8623
Niere	,8787	,8021	,8954	,7196	,9134	,9558	,7876	,8762
S-M.	,8690	,7734	,9044	,7481	,9245	,9369	,8688	,7997

Tabelle 19: Nach Delogarithmieren aus der Gleichung (11) erhaltene und auf vier Nachkommastellen gerundete Werte von a. Berechnung mit Daten aus den oben genannten Arbeiten von Fichtl und Touroutoglou. S-M. = Skelettmuskel. Substanzen: Chlorpromazin (CPZ), Diazepam (DIZ), Imipramin (IMI), Propranolol (PRO), Phenytoin (PHT), Thiopental (TPL), Warfarin (WAR), Salizylsäure (SAL).

4.7. Beziehungen zwischen den Werten von a

Als nächster Schritt wurden, analog dem unter 4.2. für die Werte von B/F Beschriebenen, nun mit den Werten von a aus Tabelle 19 Reihen gebildet und nach dem Spearman'schen Rangordnungsverfahren, nach Geweben geordnet, miteinander korreliert. Tabelle 20 zeigt die Korrelationen für Reihen von a - Werten der Pharmaka Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental, Warfarin und Salizylsäure. In Tabelle 21 sind Korrelattionen für Reihen von a - Werten ohne die der Pharmaka Salizylsäure und Chlorpromazin aufgelistet, in Tabelle 22 Korrelationen für Reihen von a - Werten ohne die der Pharmaka Propranolol und Thiopental. Tabelle 23 schließlich zeigt das Ergebnis einer Korrelationsanalyse, die, analog zu dem unter 4.3. für Werte von B/F Beschriebenen, hier mit den Werten von a aus Tabelle 19 durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der in Tabelle 20 bis 23 gezeigten Analysen werden unter 4.8. besprochen. Alle angegebenen Korrelationskoeffizienten sind positiv, wenn nicht anders vermerkt.

	Hirn	Herz	Leber	Lunge
Niere	0,762°	0,976*	0,738°	0,927*
Lunge	n.s.	0,881°	n.s.	
Leber	n.s.	0,714°		
Herz	0,738°			

Tabelle 20: Korrelationen von Reihen aus den a - Werten aus Tabelle 19 von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental, Warfarin und Salizylsäure, die nach Gewebshomogenaten geordnet wurden. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(8)}$ des einseitigen Tests berechnet. n.s. = nicht signifikant. ° = signifikant für $p < 0,05$. * = signifikant für $p < 0,01$.

	Hirn	Herz	Leber	Lunge
Niere	0,829°	1,000*	0,943*	0,886°
Lunge	n.s.	0,886°	n.s.	
Leber	0,943*	0,943*		
Herz	0,943*			

Tabelle 21: Korrelationen von Reihen aus den a - Werten aus Tabelle 19 von Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental und Warfarin, die nach Gewebshomogenaten geordnet wurden. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(6)}$ des einseitigen Tests berechnet. n.s. = nicht signifikant. ° = signifikant für $p < 0,05$. * = signifikant für $p < 0,01$.

	Hirn	Herz	Leber	Lunge
Niere	n.s.	0,943*	n.s.	0,886°
Lunge	n.s.	n.s.	n.s.	
Leber	n.s.	n.s.		
Herz	n.s.			

Tabelle 22: Korrelationen von Reihen aus den a - Werten aus Tabelle 19 von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Phenytoin, Warfarin und Salizylsäure, die nach Gewebshomogenaten geordnet wurden. Es wurden nach Spearman Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(6)}$ des einseitigen Tests berechnet. n.s. = nicht signifikant. ° = signifikant für $p < 0,05$. * = signifikant für $p < 0,01$.

	CPZ	DIZ	IMI	PRO	PHT	TPL	WAR
SAL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,886°
WAR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TPL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
PHT	n.s.	n.s.	+1,0*	+1,0*			
PRO	n.s.	n.s.	+1,0*				
IMI	n.s.	n.s.					
DIZ	+0,829°						

Tabelle 23: Korrelationen von Reihen aus den a - Werten aus Tabelle 19 von Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin, Propranolol, Phenytoin, Thiopental, Warfarin und Salizylsäure, die nach Substanzen geordnet wurden. Es wurden nach Spearman die Rangordnungskorrelationskoeffizienten $r_{s(8)}$ des einseitigen Tests berechnet. n.s. = nicht signifikant. ° = signifikant für $p < 0,05$. * = signifikant für $p < 0,01$. + = positiv korreliert. - = negativ korreliert.

4.8. Schlußfolgerungen aus den Korrelationsanalysen mit den Werten von a

Im Gegensatz zu den unter 4.2. beschriebenen und in Tabelle 12 dargestellten Korrelationen der Bindungsreihen sind die in Tabelle 20 dargestellten Korrelationen zwischen den Reihen der a-Werte weiter oder nicht signifikant. Da a, bzw. log a, in Formel (12) ein Korrekturglied gegenüber den physikalisch-chemischen Parametern darstellt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß die a-Werte möglicherweise gewebsspezifische Einflüsse auf die Bindung repräsentieren.
Während sich die in Tabelle 13 dargestellten Korrelationen der Bindungsreihen ohne die Pharmaka Chlorpromazin und Salizylsäure als weiter oder nicht signifikant erweisen, im Gegensatz zu den in Tabelle 14 dargestellten engen und zum Teil hochsignifikanten Korrelationen der Reihen ohne die Pharmaka Propranolol und Thiopental, zeigt sich bei den Korrelationen der a-Werte eine umgekehrte Situation: Reihen ohne die Pharmaka Chlorpromazin und Salizylsäure korrelieren eng und teilweise hochsignifikant (Tab. 21), Reihen ohne die Pharmaka Propranolol und Thiopental nicht signifikant oder nicht so eng (Tab. 22). Bezieht man ferner die Ergebnisse der in 4.4. und 4.5. beschriebenen Korrelationen zwischen Bindung und physikalisch - chemischen Parametern in die Überlegungen mit ein, so können folgende Schlüsse gezogen werden:
Ein erster Bindungsmechanismus, aufgezeigt durch die Korrelationen der Reihen ohne Propranolol und Thiopental, könnte vor allem durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Pharmaka bestimmt sein.
Ein zweiter Bindungsmechanismus, aufgezeigt durch die Korrelationen der Reihen ohne die Pharmaka Chlorpromazin und Salizylsäure, könnte von spezifischen Eigenschaften der Gewebe abhängig sein. Der Einfluß dieses Mechanismus könnte in Formel (12) durch a, bzw. log a, erfaßt werden.
Die in Tabelle 23 dargestellten Ergebnisse bestätigen die in Tabelle 15 dargestellten und unter 4.5. besprochenen Verhältnisse.

4.9. Bindung in Anwesenheit eines zweiten Pharmakons

Zwar konnten statistisch signifikante Unterschiede im Ausmaß der Bindungen bei Anwesenheit eines zweiten Pharmakons festgestellt werden, es konnte jedoch keine Erklärung dieses Effektes mit Hilfe von Formel (12) oder durch andere mathematisch exakt fassbare Eigenschaften der Pharmaka oder Gewebe gefunden werden.
Möglich wären unterschiedliche Affinitäten der verschiedenen Pharmaka zu ein und denselben bindungsfähigen Gewebsproteinen oder komplexen zellulären Rezeptorstrukturen mit nachfolgender Verdrängung. Auch eine Veränderung der geweblichen Bindungsstrukturen für ein Pharmakon durch die Anwesenheit eines zweiten Arzneistoffes könnte in Erwägung gezogen werden. Reaktionen der Pharmaka untereinander, ein Zerfall der Pharmakonmoleküle oder eine Alteration der Gewebshomogenate durch, im Vergleich zu den Bindungsversuchen mit einzelnen Pharmaka, veränderte Versuchsbedingungen konnten ausgeschlossen werden.

4.10. Vergleich der Bindungsverhältnisse bei Mensch und Kaninchen

Die Bindungsverhältnisse an inneren Organen des Kaninchens und des Menschen sind gut miteinander vergleichbar, wie Abb. 1 und 2 für Leber und Niere zeigen.
Daten der Gewebebindung der Pharmaka Phenytoin, Salizylsäure, Thiopental und Warfarin (Touroutoglou 1987) wurden in die Berechnung mit einbezogen.
Die Daten der Bindung an Kaninchengewebe wurden der Arbeit von Schuhmann (1985) entnommen.

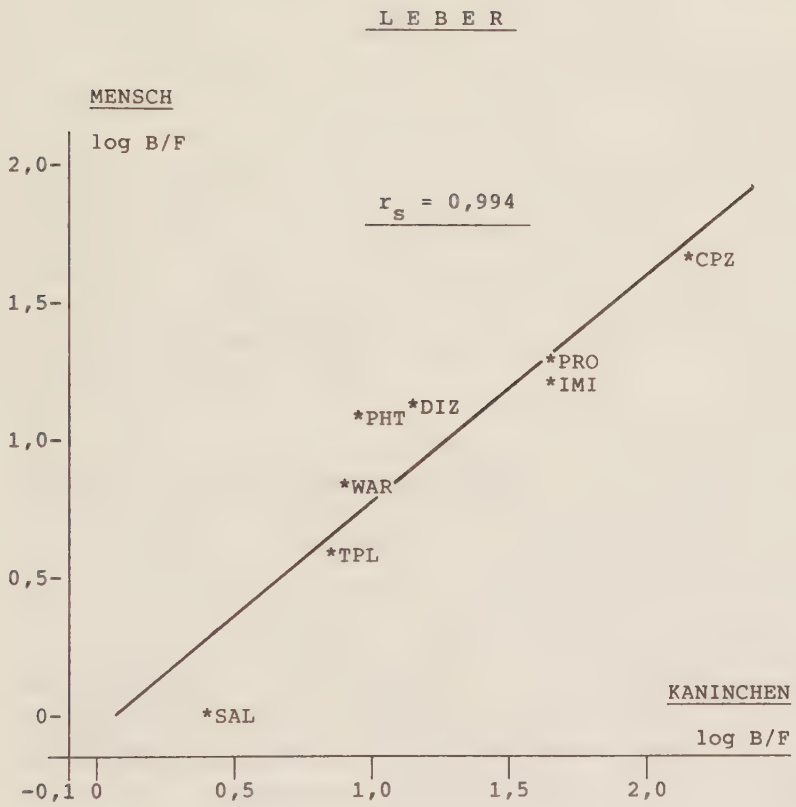

Abb. 1: Korrelation zwischen der Bindung an Kaninchenleber und an menschliches Lebergewebe. Korrelationskoeffizienten nach Spearman. Irrtumswahrscheinlichkeit für die Korrelation kleiner als 0,001. Die Regressionsgerade ist eingezeichnet.

B/F = Bindung als Verhältnis von gebundenem zu freiem Anteil eines Pharmakons

CPZ = Chlorpromazin; DIZ = Diazepam; IMI = Imipramin; PHT = Phenytoin; SAL = Salizylsäure; TPL = Thiopental; WAR = Warfarin.

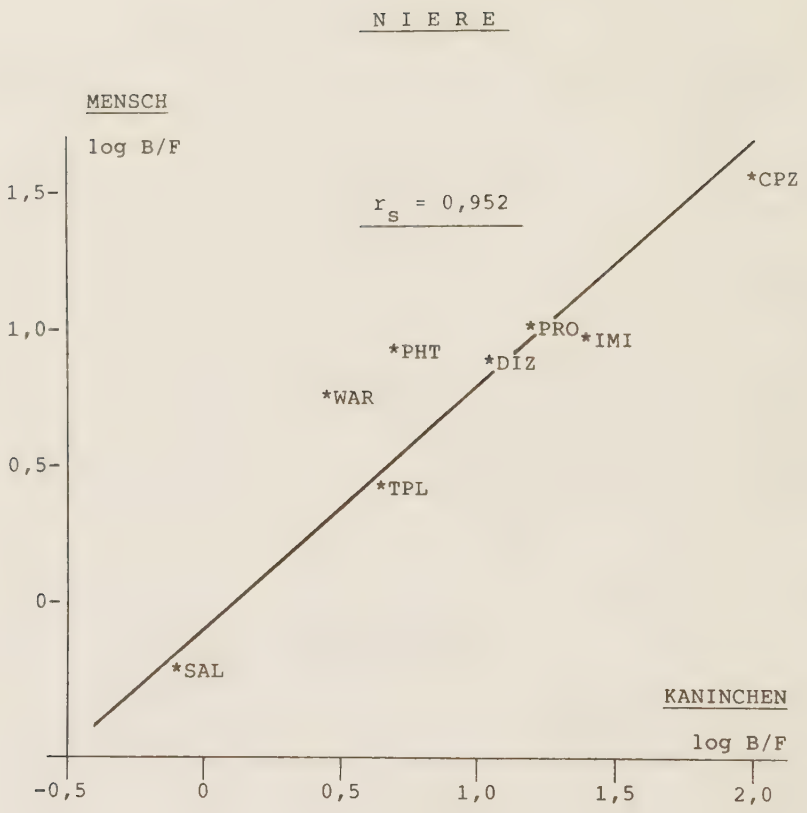

Abb. 2: Korrelation zwischen der Bindung an Kaninchenniere und an menschliches Nierengewebe. Korrelationskoeffizienten nach Spearman. Irrtumswahrscheinlichkeit für die Korrelation kleiner als 0,001. Die Regressionsgerade ist eingezeichnet.

B/F = Bindung als Verhältnis von gebundenem zu freiem Anteil eines Pharmakons

CPZ = Chlorpromazin; DIZ = Diazepam; IMI = Imipramin; PHT = Phenytoin; SAL = Salizylsäure; TPL = Thiopental; WAR = Warfarin.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Ausmaß der Bindungen der Pharmaka Chlorpromazin, Diazepam, Imipramin und Propranolol, die bei einem pH von 7,0 als Kationen vorliegen, an Gewebshomogenate von Hirn, Herz, Lunge, Leber und Niere von Unfalltoten bestimmt. Die Homogenate waren auf 50% Gewebeanteil und einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Konzentration der mit radioaktiven Tracern vermischten Arzneistoffe betrug im Meßansatz 10^{-5} Mol/l. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich das Ausmaß der Bindung bei Anwesenheit eines zweiten Pharmakons gleicher Konzentration änderte. Die Messungen erfolgten durch Ultrafiltration der Homogenate mit anschließender Bestimmung der Arzneistoffkonzentration im Ultrafiltrat durch Flüssigkeitsszintillationszählung.

Die Pharmaka wurden sehr stark an Gewebshomogenate gebunden (ca. 90% und mehr). Chlorpromazin wies an allen Homogenaten die höchsten Bindungsraten auf. Die Bindungen an Lungenhomogenate waren bei allen Pharmaka am geringsten. Das Ausmaß der Bindungen entsprach zwar etwa dem der Bindungen an Plasmaproteine, beim Vergleich der Werte ergaben sich jedoch keine signifikanten Korrelationen. Enge Korrelationen bestanden zwischen den Bindungen der Pharmaka an die einzelnen Gewebshomogenate und im Vergleich der Bindungsdaten von Mensch und Kaninchen. Aus den Versuchsergebnissen konnte eine Formel abgeleitet werden, die die Berechnung der Bindung an menschliche Gewebshomogenate aus den physikalisch-chemischen Parametern der Pharmaka ermöglicht. Es wurden Hinweise auf drei verschiedene Bindungsmechanismen gefunden: Ein Mechanismus, der von physikalisch-chemischen Eigenschaften der Pharmaka abzuhängen scheint. Ein zweiter, der möglicherweise durch spezifische Faktoren der Gewebe bestimmt wird. Ein dritter Mechanismus bei der Bindung der Pharmaka an Homogenate von Lungengewebe. In Anwesenheit eines zweiten Pharmakons war das Ausmaß der Bindung bei einigen Arzneistoffen zwar signifikant vermindert. Die Unterschiede im Vergleich mit der Bindung ohne Anwesenheit eines zweiten Pharmakons waren jedoch nur klein. Ein Verdrängungsmechanismus konnte nicht entdeckt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

M.D. Allen, D.J. Greenblatt

Comparative protein binding of diazepam and desmethyldiazepam
J. Clin. Pharmacol. 21: 219 - 223 (1981)

S.H. Curry

Relation between binding to plasma protein, apparent volume of distribution, and rate constants of disposition and elimination for chlorpromazine in three spezies
J. Pharm. Pharmacol. 24: 818 - 819 (1972)

P.G. Dayton, J.M. Perel, M.A. Landrau, L. Brand, L.C. Mark

The relationship between binding of thiopental to plasma and its distribution into adipose tissue in man, as measured by a spectrofluorometric method
Biochem. Pharmacol. 16: 2321 - 2326 (1967)

G.H. Evans, A.S. Nies, D.G. Shand

The disposition of propranolol. III.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 186: 114 - 122 (1973)

B. Fichtl

Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelgewebe
Dissertation, L.M.Universität München (1974)

B. Fichtl

Untersuchungen zur Gewebebindung von Pharmaka
Habilitationsschrift, L.M.Universität München (1983)

A. Ganshorn

Die Unterschiede der Bindung einiger Arzneimittel an Plasmaproteine vom Neugeborenen und Erwachsenen
Dissertation, L.M.Universität München (1975)

P. Gedigk, V. Totovic

Zell- und Gewebsschäden: B.III. Zelltod - Nekrose
in:
M. Eder, P. Gedigk (Hrsg.)
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie, 30. Auflage: 41 - 48
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977)

Zell- und Gewebsschäden: F. Tod des Gesamtorganismus
in:
M. Eder, P. Gedigk (Hrsg.)
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie, 30. Auflage: 66 - 68
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977)

E. Habermann

Wechselwirkungen bei der Verteilung von Arzneimitteln im Organismus
in:
G. Fülgraff, D. Palm (Hrsg.)
Pharmakotherapie, klinische Pharmakologie. E. Lehrbuch für Studierende u. Ärzte / v. F.v.Bruchhausen et al., 3. Aufl.: 353
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1979)

C.-D. Herzfeldt

Dissoziationskonstanten von Arzneistoffen.
Eine Übersichtstabelle
Pharmazeut. Ztg. 125: 608 - 614 (1980)

R. Herzog

LSC - Liquid Scintillation Counting
Pharmazie in unserer Zeit 3: 80 - 89 (1983)

C.B. Kristensen, L.F. Gram

Equilibrium dialysis for determination of protein binding of imipramine - evaluation of a method
Acta Pharmacol. et Toxicol. 50: 130 - 136 (1982)

H. Kurz, B. Fichtl

Binding of drugs to tissues
Drug Metab. Rev. 14: 467 - 510 (1983)

H. Kurz, H. Trunk, B. Weitz

Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs
Drug Res. 27: 1373 - 1380 (1977)

W. Martindale

The Extrapharmacopoiea
Pharmaceutical Press, London, 27. Aufl. (1977)

I. Odar - Cederlüf, O. Borga

Kinetics of diphenylhydantoin in uraemic patients:
Consequences of decreased plasma protein binding
Europ. J. Clin. Pharmacol. 7: 31-37 (1974)

B. Ramm, G. Hofmann

Biomathematik und medizinische Statistik, 2. Aufl.
Enke Verlag Stuttgart (1982)

H.M. Rauen (Hrsg.)

Biochemisches Taschenbuch: 656
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956)

L. Sachs

Statistische Methoden, 5. Aufl. : 80 - 94
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1982)

G. Schuhmann

Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Plasma und Gewebe in vitro und ihrer Verteilung in vivo
Dissertation, L.M.Universität München (1985)

P. Seiler

The simultaneous determination of partition coefficient and activity constant of a substance
Europ. J. Med. Chem. 9: 663 - 665 (1974)

A.M.M. Shephard, D.S. Hewick, T.A. Moreland, I.H. Stevenson

Age as a determinant of sensitivity to warfarin
Brit. J. Clin. Pharmacol. 4: 315 - 320 (1977)

N. Touroutoglou

Bindung von anionischen Pharmaka
an menschliche Gewebe
Dissertation, L.M.Universität München (1987)

7. LEBENSLAUF

Name:	Wolf Rüdiger Ritter von Horstig
Geburtsdatum:	10. April 1955
Geburtsort:	München
Eltern:	Dr.Gerhard von Horstig, Geologe, und Elfriede von Horstig, geb. Schuler, Malerin
Adresse:	Dr.Mach-str.31, 8013 Haar
Schulbildung:	Abitur mit Graecum und großem Latinum
Sprachen:	Fremdsprachen: Englisch, Italienisch Computersprachen: Basic, 6502 Assembler

Werdegang:

1961 - 1965	Volksschule in München	
1965 - 1975	Gymnasium in München:	Wilhelmsgymnasium Theresiengymnasium
1975 - 1976	Wehr- und Zivildienst:	Warburg und Bezirks- krankenhaus Haar
1976 - 1977	Studium d. Archäologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München	
1977 - 1979	Angestellt bei Fa. Cobe Laboratories, Haar	
1979 - 1980	Freiberuflicher Musiker (Gitarre, Bass) mit eigener Band	
seit 1980	Studium d. Human-Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München	
8. Mai 1987	Ärztliche Prüfung in München	
16. Juni 1987	Approbation als Arzt	